

**Experimentelle Untersuchungen
über Paramaecidie des Blutserums**

Joseph Hartmann



Digitized by the Internet Archive
in 2026

AUS DER I. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. H. SCHWIEGK

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER
PARAMAECICIDIE DES BLUTSERUMS

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von

Joseph Hartmann

aus

München

1958



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.Doz. Dr. R. MARX
Mitberichterstatter:	Professor Dr. H. SCHWIEGK
Dekan:	Professor Dr. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Oktober 1958

E I N L E I T U N G

Es ist schon lange bekannt, daß Serum von Säugetieren die Fähigkeit besitzt, primitive Lebewesen, wie Paramaecien, zu töten. Diese - Einzeller aus der Protozoengruppe - wurden erstmalig von R. RÖSSLE (20) als Testobjekt für die Wirkung von Immunkörpern auf lebende Zellen herangezogen. Seine Versuche wurden von MASUGI (13), TACHENOUCI (22), HAMILTON (7) und KNUECHEL (10) weitergeführt. R. RÖSSLE und M. MASUGI konnten beweisen, daß sowohl das Normalserum, als auch das Immunsorum paramaecicide Eigenschaften besitzt, deren Wirkungsweisen sich jedoch wesentlich voneinander unterscheiden. Auf Grund der Beobachtung, daß die paramaecicide Eigenschaft des Serums bei 30-minütiger Erwärmung auf $+56^{\circ}\text{C}$ verloren geht - also der gleichen Temperatur, die auch die Komplementwirkung aufhebt - nahmen R. RÖSSLE und M. MASUGI an, daß die paramaecicide Eigenschaft des Serums mit der Komplementwirkung identisch ist.

Das Komplement ist ein labiler, aber anscheinend der die sensibilisierte Zelle eigentlich auflösende Bestandteil. Man kann das als Komplement dienende frische Meerschweinchenserum in mehrere Komponenten zerlegen, von denen jede für sich allein zur Komplementwirkung unfähig ist, die aber vereint wieder die ursprüngliche Wirksamkeit haben. Die Komplexität des Komplements aus mindestens 4 Komponenten ist heute zu einer über jedem Zweifel stehenden Tatsache geworden. Die Komplement-Komponenten I, II, III und IV - in der amerikanischen Literatur mit $\text{C}'1$, $\text{C}'2$, $\text{C}'3$ und $\text{C}'4$ bezeichnet, - haben für die Funktion des Komplements (Co) qualitative und quantitative Bedeutung. L. PILLEMER, SEIFTER und E. ECKER (14) haben unter Bestätigung früherer Angaben von KONIKOV, EAGLE u.a. zeigen können, daß die Menge der betreffenden Komponenten, die sich mit spezifischen Aggregaten verbinden, durch eine Reihe von Faktoren bedingt ist, von denen vor allem das Alter des Komplements, die Konzentration von Antigen-Antikörper und Komplement, pH-Wert und Ionenstärke, sowie Zeit und Temperatur eine Rolle spielen. Für jede individu-

elle Komponente des Komplements besteht eine definierbare physikalisch-chemische Abhängigkeit für die Bindung.

Man weiß nun heute, daß für die lytische Funktion des Komplements die Fixierung von C'4, C'2 und gewisser Mengen von C'1 vorausgegangen sein muß; dann erst greift C'3 in das Geschehen ein und führt die Lyse herbei. Komplement-Bindung bedingt also Komplement-Zerstörung. Die Bindung von C'1, C'2 und C'4 an sensibilisierte Blutzellen ist die Ursache der Funktionszerstörung des Komplements insofern, als das gleiche Serum zur weiteren Komplement-Funktion unfähig wird. Nur C'3 wird nicht gebunden und ist daher auch nach der Bindung der anderen Faktoren noch nachweisbar.

Über die Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten des Komplements in verschiedenen tierischen Seren liegen Untersuchungen von HEGEDÜS und GREINER (9) vor. Diese haben die getrennte Herstellung der vier Komponenten beschrieben, so daß sie gegenseitig als Reagentien benutzt werden konnten. Die Autoren halten die Komplementwirkung nur für möglich, wenn sämtliche Komponenten vorhanden sind, wobei der Titer des betreffenden Serums sich nach der jeweiligen, am geringsten vorhandenen Komponente richtet. Geordnet nach Wirksamkeit des Komplements gegenüber Hammel-Blutzellen, die mittels Kaninchen-Hämolysin sensibilisiert wurden, lautet die Reihenfolge: Meerschweinchen - Ratte - Mensch - Schwein - Hund - Kaninchen (9).

Den Untersuchungsergebnissen von R.RÖSSLE und seinen Schülern, die feststellten, bei der Paramaecidie frischen Serums handle es sich um eine Komplementwirkung, steht die Behauptung von F.KNÜCHEL (10) gegenüber: Erwärmt man Serum auf verschiedene Temperaturen, so kann man beobachten, daß eine mit steigender Temperatur erreichte Inaktivierung des Serums bezüglich seiner Gerinnungsaktivität einer entsprechend schwächer werdenden Wirkung der Paramaecidie parallel geht. Aus diesen und einigen anderen Versuchen, die ihn in seiner Annahme bekräftigten, folgerte er, daß das wirksame Agens ein Gerinnungsfaktor ist, nämlich Thrombin. Von R.MARX und M.STANISLAUS wurde 1955 diese Frage untersucht und die Thrombin-Hypothese wiederlegt.

Heute ist uns der Zusammenhang zwischen Prothrombin und Komplement bekannt und weitgehend durch die Arbeiten von R. MARX (12), VINET u.a. geklärt, so daß wir mit Sicherheit behaupten können, daß die paramaeciciden Eigenschaften des Normalserums nicht auf Thrombin beruhen.

1954 gelang es L. PILLEMER (17, 18) und seinen Mitarbeitern, ein Agens zu entdecken und zu isolieren, dem er im Rahmen seiner Zugehörigkeit zum Abwehrsystem des Organismus biozide Wirkung zuschreibt und als "PROPERDIN" anspricht.

Properdin soll ein im Serum befindlicher hochmolekularer Eiweißkörper sein, welcher nur in Verbindung mit Komplement und Magnesium-Ionen in dissoziierter Lösung wirkt, wobei er Viren zu neutralisieren, Bakterien zu töten und gewisse Blutzellen zu lösen vermag. Es ist jedoch nach L. PILLEMER (19) kein Antikörper, von dem es sich durch seinen Mangel an Spezifität und seine besonderen Wirkungsbedingungen unterscheidet.

Die Bestimmung nach L. PILLEMER und Mitarbeitern (17), die heute noch die einzige Methode zum Nachweis des Properdins darstellt, ist äußerst umständlich. Sie beruht auf der Reaktion dieser Substanz mit der 3. Komponente des Komplements (C^3) in definierten Mengenverhältnissen und in Gegenwart von Zymosan, einem Präparat der Hefe-Zellmembran.

Zunächst werden verschiedene Mengen des zu untersuchenden Serums einer konstanten Menge Serum (RP) zugefügt, welcher das Properdin durch Zymosan bei $+17^{\circ}\text{C}$ entzogen wurde. Jedem Röhrchen wird eine Standardmenge Zymosan beigegeben.

Während der Inkubation bei $+37^{\circ}\text{C}$ vereinigt sich das Properdin des zu prüfenden Serums quantitativ mit Zymosan, sofern RP genügend C^3 enthält.

Nach einstündiger Inkubation bei 37°C werden die Proben zentrifugiert und der oben schwimmenden Schicht sensibilisierte Erythrozyten zugefügt.

Bei jenen Proben, in denen nach der Reaktion mit Properdin immer

noch ein Überschuß an C'3 vorhanden ist, tritt Hämolyse ein. Der Titrationsendpunkt liegt zwischen dem Wert der letzten Probe, die keine Hämolyse zeigt, und dem der ersten, bei der eine solche stattfindet.

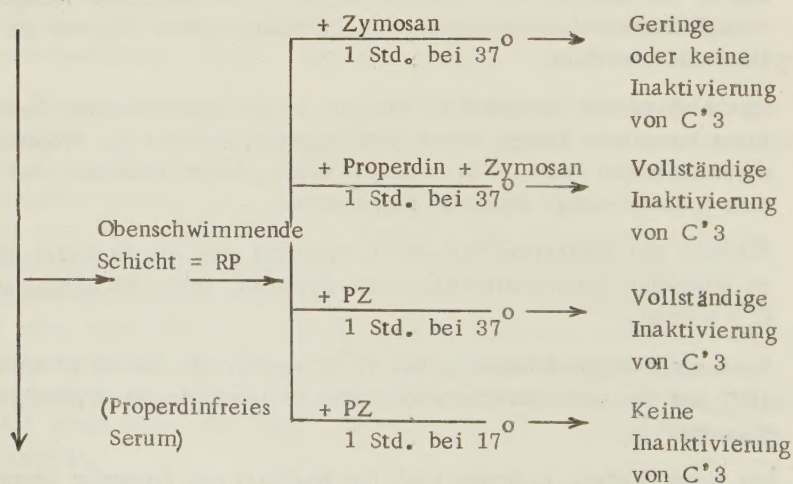
Wie andere Komplementbindungsreaktionen beruht auch diese auf einer Verdünnungsmethode und gibt nur an, ob in einem bestimmten Volumen Serum genügend Properdin vorhanden ist, um mit der Standardmenge der 3. Komponente zu reagieren.

Die partielle Reinigung des Properdins erfolgt durch Adsorption an Zymosan und anschließende Eluierung, sowie durch Dialyse und Ultrazentrifugierung. Die auf diese Weise gewonnene Substanz ist ein Euglobulin von hohem Molekulargewicht, dessen Anteil am Serumprotein weniger als 0,03 % beträgt.

Wie A.C. WARDLOW und L. PILLEMER (23) einwandfrei nachweisen konnten, vermag partiell gereinigtes Properdin, welches den Komplement-Komponenten zugesetzt wird, in vitro baktericide Systeme zu bilden.

Serum + Zymosan

1 Std. bei 17°



Rückstand = PZ

(Properdin-Zymosan-Komplex)

Abb. Kombination von Zymosan mit einer Substanz Properdin in menschlichem Serum, die für die Inaktivierung von C³ durch Zymosan bei 37⁰ C erforderlich ist. (Nach L. PILLEMER et al. 17)

Meine im Nachfolgenden beschriebenen Untersuchungen verfolgten das Ziel, zur Kenntnis der im normalen Serum enthaltenen paramaeciden Substanz (en) beizutragen. Es soll versucht werden, festzustellen, ob dem Properdin-Komplement-System tatsächlich paramaecide Wirkung zuzuschreiben ist.

Meinen Untersuchungen setzte ich voraus, daß diese von L. PILLEMER (19) entdeckte Substanz im Blut von Säugetieren tatsächlich vorhanden ist und daß sie durch ein Polysaccharid aus der Hefezellwand (Zymosan) durch Inaktivierung der Komplement-Komponente C³ in ihrer Funktion gehemmt wird.

Für meine Versuche wurde das sowohl von R. RÖSLE und seinen Schülern, als auch von F. KNÜCHEL verwendete *Paramecium caudatum* Ehrbg. aus der Reihe der Protozoen gewählt. Es ist besonders geeignet wegen seiner Größe und vollständigen Zellstruktur. Schließlich besteht die Möglichkeit, Einzeller unter ihren natürlichen Lebensbedingungen der Wirkung des Serums auszusetzen und jederzeit entscheiden zu können, ob man lebende oder tote Objekte vor sich hat. Diese Untersuchungsmethode läßt allerdings keine Schlüsse auf den Wirkungsmechanismus im Paramaecienkörper selbst zu. Sie will lediglich zeigen, daß die Wirkung der tötenden Substanz (en) in erster Linie von der Konzentration der tötenden Stoffe des Kulturmediums abhängig ist; zweitens will sie beweisen, daß es möglich ist, im Serum selbst die tötende Wirkung abzuschwächen oder sogar ganz aufzuheben.

METHODIK

Die normale Lokomotion der Paramaecien beschreibt eine Schraube mit sehr lang gezogenen Windungen nach vorwärts. Die pathologische Drehbewegung nach vor- oder rückwärts besteht in der Ausführung einer Schraube mit mehr und mehr verschwindender Höhe der Schraubengänge, bis schließlich eine Drehung am Platze eintritt - und zwar

nicht um die sagittale, sondern um die horizontale Achse -, die sich immer mehr verlangsamt. Man kann in diesem und dem Stadium vollkommener Lähmung, in welches die Drehung ausgeht, durch kalorische und mechanische Reize die Paramaecien zu kurzen, sofort nachlassenden Vorwärtsbewegungen oder auch zu Wirbeln veranlassen, falls nicht unterdessen eine weitere Erscheinung eingetreten ist, die auch selbständig vor Eintritt der Lähmung platzgreifen kann.

Setzt man zum Wasser, in welchem die Paramaecien schwimmen, ein Serum zu, so geraten sie zunächst in Erregung, die aber bald in Lähmung übergeht: die Paramaecien verlieren zunächst ihre Motilität und sinken zu Boden. (Allmählicher Stillstand der Ortsbewegung, was mit Lähmung der Fortbewegungsorgane gleichzusetzen ist.)

In konzentriertem Serummilieu geht die Lähmung noch weiter; sie greift auch die Excretionsorgane (kontraktile Vakuole) sowie das Nahrungsaufnahmeorgan (undulierende Membran) an, wodurch die Paramaecien getötet werden. Hierbei kann zunächst eine Erregung der inneren Teile der Tiere, dann eine Verlangsamung der inneren Bewegungsvorgänge (Endoplasmaströmung) beobachtet werden.

Beim Absterben zeigen die Paramaecien Zerfließungserscheinungen. Es wurden auch Verklebungen der Tiere mit der Oberfläche fester Körper beobachtet. Sie blieben jedoch nie aneinander haften, sondern immer an Glas oder Bakterienhaufen.

Agglutination im Sinne der Vorgänge an Erythrozyten bei der Blutgerinnung konnte nicht beobachtet werden. Die toten (zerplatzten) Paramaecien lagen immer getrennt voneinander. Es mag hier vorweggenommen werden, daß die Intensität der Wirkung in Bezug auf die Zahl der gelähmten Paramaecien, in Bezug auf den Lähmungsgrad der einzelnen Tiere sowie die Zeit, in welcher die Lähmung eintrat, der Menge des jeweils verwendeten Serums proportional war.

Die Methodik meiner Versuche paßte ich den fünf mir gestellten Zielen an:

1. Komparative Überprüfung der Versuchsobjekte (Tier, Mensch) in Bezug auf die Intensität des antimikrobiellen Wirkungsspektrums der im Serum enthaltenen aktiven Substanzen (indirekte Titerbestimmungen).

2. Erkenntnisse der Abhängigkeit äußerer Bedingungen (Temperatur) auf den zeitlichen Ablauf der paramaeciciden Wirkung der Serum-agentien.
3. Die Beeinflußbarkeit der Reaktionskinetik des Serums in Bezug auf seine paramaecicide Wirkung durch chemische Komponenten (Barium sulfuricum, Permutit, Heparinoid G, Elheparin, Heparin Novo, Hefe und Zymosan).
4. Immunisierung der Paramaecien gegen normales Menschenserum.
5. Überprüfung der Beziehung der Paramaecicidie des Serums zum Gammaglobulin an Hand von Serum von Patientinnen, die an einer Agamma- (= 0) oder Hypogammaglobulinämie (= 7 - 9) litten.

VERSUCHSERGEBNISSE

Vorversuche:

Um die Versuchsergebnisse möglichst genau auswerten zu können, mußten einige Vorversuche angestellt werden. Sie sollen dazu dienen, die optimalen Lebensbedingungen der Paramaecien (ohne Serumbeimischung) in Bezug auf pH-Werte und Temperatur zu untersuchen.

Temperaturverhalten von Paramaecium caudatum in 12 Stunden:

Versuch 1

Bei 0⁰: alle Tiere blieben am Leben, bewegten sich jedoch träge.

Versuch 2

Bei +4⁰ C: alle Tiere blieben am Leben, bewegten sich jedoch langsamer, als normal.

Versuch 3

Bei $+17^{\circ}\text{C}$: alle Tiere blieben am Leben und bewegten sich sehr gut; es wurde Vermehrung der Tiere festgestellt.

Versuch 4

Bei $+26^{\circ}\text{C}$: alle Tiere blieben am Leben, bewegten sich sehr gut und vermehrten sich.

Versuch 5

Bei $+31^{\circ}\text{C}$: Verhalten der Tiere wie in Versuch 4.

Versuch 6

Bei $+33^{\circ}\text{C}$: Verhalten wie bei Versuch 4 und 5.

Versuch 7

Bei $+37^{\circ}\text{C}$: Alle Tiere bewegten sich sehr gut; Vermehrung konnte keine mehr beobachtet werden. Die Paramaecien scheinen nur noch vegetativ zu leben.

Versuch 8

Bei $+45^{\circ}\text{C}$: alle Tiere wurden innerhalb kurzer Zeit getötet.

Verhalten der Paramaecien bei Änderung des pH-Wertes:

Die Versuche wurden mit physiologischer Kochsalzlösung durchgeführt.

Versuch 1: Verdünnung 1:15: keine Bewegungsstörungen, keine Gestaltsveränderung.

Versuch 2: Verdünnung 1:5: wie in Versuch 1.

Versuch 3: Verdünnung 1:2: wie in Versuchen 1 und 2.

Versuch 4: Nur physiolog. Kochsalzlösung: zunächst war eine kleine Schreckreaktion zu beobachten. Innerhalb 5 bis 10 Minuten normalisierte sich jedoch die Bewegung der Tiere.

Nach diesen, dem Grundsätzlichen dienenden Vorversuchen konnten die eigentlichen Versuche im Sinne der mir gesteckten Ziele in Angriff genommen werden. Hierbei diene als

Material:

Serum von Meerschweinchen	Barium sulfuricum
Mensch	Permutit
weißer Maus	Heparinoid G
Kaninchen	Elheparin
Schwein	Heparin Novo
Ratte	Zymosan (Behringwerke)
	Zymosan (Physiol.-Chem.Inst.der Universität München)

Kulturen:

Paramaecium caudatum (vom Zoologischen Inst. der Universität München)

Hefe (*Saccharomycis cerevisiae*).

In allen Versuchen wurde das Blut von mindestens fünf Tieren bei einem pH-Wert von 7 - 7,5 spätestens 2 Stunden nach der Entnahme mehrmals geprüft.

A. Komperative Überprüfung

Versuch I a: 3 ccm normalen Meerschweinchenblutes - gewonnen durch Herzpunktion - wurden mittels eines Holzstabes defibriniert und anschließend abzentrifugiert (10 Min. mit 2000 U/Min.).

0,5 ccm Serum wurde abpipettiert und mit 3 Teilen abgestandenem Leitungswasser und 1 Teil *Paramaecien*aufschwemmung verdünnt. Eine zweite Verdünnung wurde aus 0,5 ccm desselben Serums, 12 Teilen Leitungswasser und 2 Teilen *Paramaecien*aufschwemmung hergestellt. Beide Verdünnungen wurden in den Brutschrank mit 37° C gestellt und in Abständen von 5 bis 10 Minuten auf einem Objektträger unter dem Mikroskop bei Lupenvergrößerung geprüft.

Ergebnis:	Tier	Verdünnung 1:5
	1	alle Paramaecien nach 130 Min. tot
	2	" " " 153 " "
	3	" " " 120 " "
	4	" " " 140 " "
	5	" " " 150 " "
	Im Mittel $693 : 5 =$ 138,6 Min.	

Tier	Verdünnung 1:15
1	größter Teil der Param nach 180 Min. am Leben
2	" " " " " 180 " " "
3	" " " " " 180 " " "
4	" " " " " 180 " " "
5	" " " " " 180 " " "

Das defibrinierte Blutserum von Meerschweinchen weist unter normalen Bedingungen *in vitro* paramaecientötende Eigenschaften auf, die auf das Vorhandensein von noch nicht mit Sicherheit definierbaren Agentien zurückzuführen sind. Die Menge dieser Agentien scheint von großer Bedeutung zu sein, da mit wachsender Verdünnung die paramaecientötende Wirkung abnimmt.

Versuch II a: 10 ccm nativen Blutes vom Menschen wurden mittels eines Holzstabes defibriniert, die festen Bestandteile in 10 Minuten mit 2000 U/Min. abzentrifugiert und zwei Lösungen hergestellt - 1:5 und 1:15 - , die bei 37° C in den Brutschrank gestellt und in Abständen von 2 bis 3 Minuten überprüft wurden.

Ergebnis:	Patient	Verdünnung 1:5
	1	alle Param. nach 15 Min. tot
	2	" " " 16 " "
	3	" " " 17 " "
	4	" " " 20 " "
	5	" " " 22 " "
	Im Mittel $90 : 5 =$ 18 Min.	

Patient	Verdünnung 1 : 15				
1	alle Param.	nach	43 Min.	tot	
2	"	"	"	50	" "
3	"	"	"	48	" "
4	"	"	"	50	" "
5	"	"	"	62	" "
Im Mittel 259 : 5 =					51,8 Min.

Das defibrinierte Blut des Menschen weist unter den angegebenen Bedingungen eine etwa 7 bis 8 mal stärkere paramaecicide Wirkung als das Serum des Meerschweinchens auf.

Versuch III a: Das Blut wurde jeweils von zwei weißen Mäusen durch Dekapitation gewonnen. 1 ccm normalen Serums dieser Mäuse wurde vorbehandelt wie oben angegeben. Es wurden wiederum zwei Lösungen hergestellt - 1 : 5 und 1 : 15 -, im Brutschrank auf 37° C erwärmt und anschließend in Abständen von 2 bis 5 Minuten überprüft.

<u>Ergebnis:</u>	Tier	Verdünnung 1 : 5					Verdünnung 1 : 15				
	1	alle Param.	nach	13 Min.	tot		nach	29 Min.	tot		
	2	"	"	"	12	" "	"	27	" "		
	3	"	"	"	10	" "	"	30	" "		
	4	"	"	"	10	" "	"	26	" "		
	5	"	"	"	9	" "	"	39	" "		
Im Mittel 54 : 5 =					10,8 Min.		151 : 5 =	30,2 Min.			

Das defibrinierte Serum weißer Mäuse weist unter den angegebenen Bedingungen eine zweimal stärkere paramaecicide Wirkung als Menschenserum auf.

Versuch IV a: 5 ccm natives Kaninchenblut - aus der Ohrvene entnommen - wurden auf die oben angegebene Weise vorbehandelt. Wiederum wurden 2 Verdünnungen, 1 : 5 und 1 : 15, bei Zimmertemperatur hergestellt, im Brutschrank auf 37° C erwärmt und in Abständen von 3 bis 5 Minuten überprüft.

Ergebnis:

Tier	Verdünnung	1 : 5	Verdünnung	1 : 15
1	alle Param.	nach 9 Min. tot	nach 23 Min. tot	
2	"	" 7 " "	" 27 " "	
3	"	" 10 " "	" 24 " "	
4	"	" 12 " "	" 23 " "	
5	"	" 8 " "	" 24 " "	

Im Mittel $46 : 5 = 9,2 \text{ Min.}$ $116 : 5 = 23,5 \text{ Min.}$

Defibriertes Kaninchenserum weist unter den gleichen äußeren Bedingungen eine stärkere paramaecicide Wirkung auf, als das Serum von weißen Mäusen.

Versuch V a: 5 ccm natives Blut vom Hausschwein wurde auf die oben angegebene Weise vorbehandelt. Zwei Verdünnungen - 1 : 5 und 1 : 15 - wurden vorbereitet, bei Zimmertemperatur gemischt, im Brutschrank auf 37°C erwärmt und in Abständen von 2 bis 4 Minuten geprüft.

Ergebnis:

Tier	Verdünnung	1 : 5	Verdünnung	1 : 15
1	alle Param.	nach 5 Min. tot	nach 15 Min. tot	
2	"	" 6 " "	" 16 " "	
3	"	" 5 " "	" 15 " "	
4	"	" 6 " "	" 15 " "	
5	"	" 6 " "	" 17 " "	

Im Mittel $28 : 5 = 5,6 \text{ Min.}$ $78 : 5 = 15,6 \text{ Min.}$

Das Serum vom Schwein weist unter den angegebenen Bedingungen eine etwa eineinhalbfach stärkere paramaecicide Wirkung auf, als Kaninchenserum.

Versuch VI a: 3 ccm Serum einer Ratte wurden vorbehandelt wie oben angegeben. Das Verdünnungsverhältnis betrug ebenfalls wieder 1 : 5 bzw. 1 : 15. Bei Zimmertemperatur gemischt, wurde die Lösung im Brutschrank auf 37°C erwärmt und in Abständen von 1 bis 2 Minuten überprüft.

Ergebnis:

Tier	Verdünnung 1 : 5	Verdünnung 1 : 15
1	alle Param. nach 3 Min. tot	nach 10 Min. tot
2	" " " 4 " "	" 11 " "
3	" " " 4 " "	" 11 " "
4	" " " 3 " "	" 10 " "
5	" " " 5 " "	" 11 " "

Im Mittel $19 : 5 = 3,8 \text{ Min.}$ $53 : 5 = 10,6 \text{ Min.}$

Defibriniertes Rattenserum scheint von den hier untersuchten Sera am meisten paramaecientötendes Agens zu besitzen. Es hat eine eineinhalbmal stärkere paramaecicide Wirkung als das Serum vom Schwein.

Übersicht der Versuche Ia bis VIa:

(Die angegebenen Zeiten sind errechnete Mittelwerte)

Serum von	Verd. 1 : 5	Verd. 1 : 15
Ratte	tötet Paramaecien nach 3,8 Min.	10,6 Min.
Schwein	" " " 5,6 "	15,6 "
Kaninchen	" " " 9,2 "	23,2 "
weißer Maus	" " " 10,8 "	30,2 "
Mensch	" " " 18,0 "	51,8 "
Meerschweinchen	" " " 130,6 "	nach 180 Min. noch am Leben.

Properdintiter - Bestimmung nach L. PILLEMER (9) in P-Einheiten:

Ratte	25 - 50
Maus	10 - 20
Schwein	8 - 12
Mensch	4 - 8
Meerschweinchen	1 - 2

Anmerkung

Eine Properdin-Einheit ist die kleinste Menge, welche unter bestimmten Bedingungen und bei Gegenwart von Zymosan in einem RP den C'3 Titer vom Anfangswert 120 Einh./ccm auf Null reduziert.

Bei $+17^{\circ}\text{C}$ bindet sich Z mit P und bildet unlösliches P-Z, welches C'3 bei $+37^{\circ}\text{C}$, jedoch nicht bei $+17^{\circ}\text{C}$, inaktiviert. In einem Serum ohne P (RP) bleibt Z bei beiden Temperaturen ohne Wirkung auf C'3.

Jedoch wird im RP C'3 inaktiviert bei Zusatz von Properdin und Zymosan. Auf diesen Unterschied zwischen RP und normalem Serum konnte ein Meßverfahren für Properdin entwickelt werden:

In einem Milieu mit hoher Ionenstärke dissoziiert Properdin-Zymosan (PZ), was zur Reinigung von Properdin benutzt werden kann.

B. Änderung der äußeren Bedingungen (Temperatur)

In dieser Versuchsreihe wurden Sera von Mensch und Kaninchen geprüft.

Versuch I b: 10 ccm natives Serum vom Menschen wurden auf die bereits bei den Versuchen der Reihe A angegebene Weise vorbehandelt, jedoch wurde nur eine Lösung im Verdünnungsverhältnis 1 : 5 hergestellt. Die Versuchsbedingungen wurden nun insofern geändert, als alle Teile getrennt 15 Minuten lang in den Kühlschrank gestellt, dann gemischt und wieder in den Kühlschrank bei $+4^{\circ}\text{C}$ gestellt wurden.

<u>Ergebnis:</u>	<u>Patient</u>	<u>Verdünnung 1 : 5</u>
	1	Nach 120 Minuten waren alle Paramaecien am Leben. Die Bewegung war langsamer. Die Tiere zeigten Schrumpfungerscheinungen und waren abgeplattet.
	2	
	3	
	4	
	5	

Bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ scheinen die paramaecientötenden Agentien im Serum keine Angriffsmöglichkeiten mehr zu besitzen. Die Wirkung scheint demnach enzymatischer Natur zu sein und verläuft bei dieser niedrigen Temperatur entweder überhaupt nicht, oder aber so langsam, daß es nur allmählich und sehr spät zu einer Lähmung der Paramaecien kommen kann.

Versuch II b: Die Bedingungen waren die gleichen, wie beim vorhergegangenen Versuch angeführt; lediglich die Ausgangstemperatur wurde geändert (Zimmertemperatur von +17 bis +18^o C).

<u>Ergebnis:</u>	Patient	Verdünnung 1 : 5
	1	Alle Paramaecien nach 30 Min. tot
	2	" " " 33 " "
	3	" " " 28 " "
	4	" " " 35 " "
	5	" " " 29 " "

Die Zimmertemperatur ermöglicht wohl den Angriff der paramaeciciden Agentien im Serum, scheint aber für die Bindung nicht optimal zu sein.

Versuch III b: 10 ccm natives Blut vom Menschen wurden vorbehandelt wie oben angegeben. Die Versuchsbedingungen wurden insofern geändert, als 1 Teil des defibrinierten Serum: 30 Minuten lang auf +56^o C erhitzt wurde; dann wurden 3 Teile abgestandenes Leitungswasser und 1 Teil Paramaecienaufschwemmung zugesetzt und die Lösung bei +37^o C in den Brutschrank gestellt.

Ergebnis: Im Serum der 5 Patienten war bei einer Verdünnung von 1 : 5 der größte Teil der Paramaecien nach 120 Minuten noch am Leben.

Das 30 Minuten auf +56^o C erhitzte Serum scheint seine paramaecien-tötende Wirkung fast vollständig zu verlieren.

Ergänzend sei hier eingefügt, daß die in diesem Versuch verwendeten Paramaecien anschließend in den Kühlschrank gestellt wurden. Bei der nach 24 Stunden vorgenommenen Untersuchung waren noch alle am Leben.

Abschließend kann aus den Versuchen dieser Reihe mit Menschenserum gefolgert werden, daß die Temperatur von +37^o C doch nicht für alle Paramaecien-Kulturen optimal zu sein scheint, da auch im Kontrollröhrchen - in welchem sich nur Paramaecienaufschwemmung bei kon-

stanter Temperatur von $+37^{\circ}\text{C}$ befand - ein kleiner Teil der Tiere zu Grunde gegangen war. Eine andere Deutung des beobachteten Phänomens wäre die, daß es im Serum doch einen paramaecientötenden Stoff gibt, der auch durch Erhitzen auf $+56^{\circ}\text{C}$ während 30 Minuten nicht ganz zerstört wird. Seine optimalen Wirkungsbedingungen dürften $+37^{\circ}\text{C}$ sein, da er bei Herabsetzung der Temperatur auf $+4^{\circ}\text{C}$ seine Wirksamkeit zu verlieren scheint.

Versuche mit Kaninchenserum:

Die gleichen Versuche, wie eben beschrieben (Ib - IIb), wurden bei denselben Versuchsbedingungen mit Kaninchenserum wiederholt. Die Resultate der mit Menschenserum durchgeführten Reihe wurden hierbei bestätigt:

Die paramaecientötenden Substanzen im Kaninchenserum zeigten relativ die gleiche Abhängigkeit von der Temperatur wie im Menschenserum.

C. Chemische Komponente

Versuch I c: Die Vorbedingungen waren die gleichen wie bisher. Der Versuch wurde parallel mit Menschen- und Kaninchenserum durchgeführt, wobei jeweils 2 ccm defibriniertes Serum von Mensch und Kaninchen getrennt mit 200 mg Permutit gemischt, 5 Minuten bei $+32^{\circ}\text{C}$ geschüttelt und für 15 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$ in den Brutschrank gestellt wurde. Anschließend wurde mit 4000 U/Min. scharf abzentrifugiert. Außerdem wurden zwei Kontrollversuche mit den oben angegebenen Sera, jedoch ohne Permutit angesetzt.

<u>Ergebnis:</u>		<u>Menschenserum</u>
	Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
	Alle Param. nach 33 Min. tot	nach 16 Min. tot
	Verdünnung 1 : 15	Kontrollversuch
	Alle Param. nach 76 Min. tot	nach 46 Min. tot

Kaninchenserum	
Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param. nach 25 Min. tot	nach 11 Min. tot
Verdünnung 1 : 15	Kontrollversuch
Alle Param. nach 40 Min. tot	nach 23 Min. tot

Permutit scheint einen Teil des paramaecientötenden Agens zu absorbieren.

Versuch II c: Dieser Versuch wurde wie der soeben beschriebene ausgeführt, jedoch wurde an Stelle von Permutit Barium sulfuricum verwendet.

Menschenserum	
Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param. nach 48 Min. tot	nach 16 Min. tot
Verdünnung 1 : 15	Kontrollversuch
Alle Param. nach 90 Min. tot	nach 48 Min. tot
Kaninchenserum	
Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param. nach 33 Min. tot	nach 11 Min. tot
Verdünnung 1 : 15	Kontrollversuch
Alle Param. nach 43 Min. tot	nach 21 Min. tot

Barium sulfuricum scheint das paramaecicide Agens im Serum etwas stärker zu absorbieren als Permutit.

Versuch III c: Die Vorbedingungen blieben die gleichen, wie oben beschrieben. Auch hier wurde wieder parallel mit Menschen- und Kaninchenserum gearbeitet, wobei je 2 ccm defibriniertes Serum von Mensch und Kaninchen getrennt mit 200 mg Heparinoid G gemischt und anschließend in Verdünnungen von 1 : 5 und 1 : 15 in den Brutschrank gestellt wurden. Die Untersuchung erfolgte dann alle 5 bis 10 Minuten.

Ergebnis:

Menschenserum		
Verdünnung	1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param.	nach 240 Min. am Leben	nach 21 Min. tot
Verdünnung	1 : 15	Kontrollversuch
Alle Param.	nach 240 Min. am Leben	nach 70 Min. tot
Kaninchenserum		
Verdünnung	1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param.	nach 115 Min. am Leben	nach 13 Min. tot
Verdünnung	1 : 15	Kontrollversuch
Alle Param.	nach 240 Min. am Leben	nach 22 Min. tot

Heparinoid G setzt die Paramaecidie im Serum stark herab und zwar beim Menschen stärker als beim Kaninchen. Hierbei scheint eine Abhängigkeit von der Stärke der paramaecientötenden Agentien des jeweiligen Serums zu bestehen: je weniger paramaecicide Stoffe das Serum enthält, desto weitreichender wird es inaktiviert.

Versuch IV c:

Die Versuchsbedingungen blieben die gleichen, wie in den vorher beschriebenen Versuchen, jedoch wurde an Stelle von Heparinoid G Elheparin verwendet.

Ergebnis:

Menschenserum		
Verdünnung	1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param.	nach 240 Min. sehr lebendig	nach 20 Min. tot
Verdünnung	1 : 15	Kontrollversuch
Alle Param.	nach 240 Min. sehr lebendig	nach 62 Min. tot

Kaninchenserum	
Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param. nach 240 Min. sehr lebendig	nach 13 Min. tot
Verdünnung 1 : 15	Kontrollversuch
Alle Param. nach 240 Min. sehr lebendig	nach 22 Min. tot

Elheparin setzt die paramaecientötende Wirkung im Serum noch stärker herab, als Heparinoid G.

Versuch V c: Die Vorbedingungen auch dieses Versuches blieben dieselben. An Stelle von Elheparin wurde nun aber Heparin Novo verwendet.

Ergebnis:

Menschenserum	
Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param. nach 240 Min. sehr lebendig	nach 18 Min. tot
Verdünnung 1 : 15	Kontrollversuch
Alle Param. nach 240 Min. sehr lebendig	nach 60 Min. tot
Kaninchenserum	
Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param. nach 240 Min. sehr lebendig	nach 12 Min. tot
Verdünnung 1 : 15	Kontrollversuch
Alle Param. nach 240 Min. sehr lebendig	nach 21 Min. tot

Heparin Novo scheint die paramaecicide Wirkung im Serum von Mensch und Kaninchen in gleicher Weise herabzusetzen wie Elheparin.

Versuch VI c: Dieser, sowie die folgenden Versuche der Reihe C wurden mit Rattenserum durchgeführt bei im übrigen unveränderten Versuchsbedingungen. Es wurde zunächst Heparin G im gleichen Mischungsverhältnis, wie unter Versuch III c angegeben, verwendet.

Ergebnis:Rattenserum

Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Lähmung der Param. nach 70 Min.	nach 5 Min. tot

Verdünnung 1 : 15	Kontrollversuch
Sehr leichte Lähmung nach 95 Min.	nach 11 Min. tot

Versuch VII c:

Hier wurde statt Heparinoid G Elheparin verwendet.

Ergebnis:Rattenserum

Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Leichte Lähmung der Param. nach 120 Min.	nach 4 Min. tot

Verdünnung 1 : 15	
Sehr leichte Lähmung nach 145 Min.	nach 11 Min. tot

Versuch VIII c:

An Stelle von Elheparin gelangte hier Heparin Novo zur Anwendung.

Ergebnis:Rattenserum

Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Leichte Lähmung der Param. nach 120 Min.	nach 4 Min. tot

Verdünnung 1 : 15	
Sehr leichte Lähmung nach 145 Min.	nach 11 Min. tot

Aus den mit Rattenserum angestellten Versuchen VI c bis VIII c kann gefolgert werden, daß Elheparin und Heparin Novo die paramaecicide Wirkung in defibriniertem Serum stärker hemmt, als Heparin G. Das Rattenserum scheint gegen die verwendeten Heparinoide eine größere Resistenz zu besitzen, als das Serum von Mensch und Kaninchen. Ob die Quantität der paramaecientötenden Stoffe im Rattenserum hierbei eine Rolle spielt, muß offengelassen werden.

Schematische Übersicht der Versuche Ic bis VIIIc

(Gerinnungshemmende und die Bakterizidie herabsetzende Substanzen)

Serum von Mensch

Substanzen	Verdünnung 1 : 5		Verdünnung 1 : 15	
	Adsorb.	Kontrolle	Adsorb.	Kontrolle
Permutit	33' +	16' +	76' +	46' +
BaSO ₄	48' +	16' +	90' +	48' +
Hepar. G	240' !	21' !	240' !	70' +
Elheparin	240' !!	20' +	240' !!	62' +
Hep. Novo	240' !!	18' +	240' !!	60' +

Serum von Kaninchen

Substanzen	Verdünnung 1 : 5		Verdünnung 1 : 15	
	Adsorb.	Kontrolle	Adsorb.	Kontrolle
Permutit	25' +	11' +	40' +	23' +
BaSO ₄	33' +	11' +	43' +	21' +
Hepar. G.	115' +	13' +	240' !	22' +
Eleparin	240' !!	13' +	240' !!	22' +
Hep. Novo	240' !!	12' +	240' !!	20' +

Serum von Ratte

Substanzen	Verdünnung 1 : 5		Verdünnung 1 : 15	
	Adsorb.	Kontrolle	Adsorb.	Kontrolle
Hepar. G.	70' ??	4' +	95' ?	11' +
Elheparin	120' ?	4' +	145' ?	11' +
Hep. Novo	120' ?	4' +	145' ?	11' +

Zeichenerklärung:	'	=	Minute
	+	=	tot
	!	=	lebendig
	!!	=	sehr lebendig und gefräßig
	?	=	leichte Lähmung
	??	=	mittelstarke Lähmung

Versuch IX c: Wie bei allen bisher beschriebenen Versuchen dieser Reihe, blieben auch hier die Vorbedingungen unverändert. Eine Abänderung der Anordnung ergibt sich daraus, daß 2 ccm defibriniertes Serum vom Menschen mit 0,5 ccm gewaschener Bierhefe bei $+4^{\circ}\text{C}$ gemischt und 60 Minuten lang im Kühlschrank der gleichen Temperatur ausgesetzt wurde. Anschließend wurde die abgekühlte Lösung 5 Minuten scharf abzentrifugiert und das Serum abpipettiert. Dieses mit Hefe behandelte Serum wurde dann bei Zimmertemperatur mit 3, bzw. 12 Teilen abgestandenem Leitungswasser und einem, bzw. 2 Teilen Paramaecienaufschwemmung vermischt und in den Brutschrank mit $+37^{\circ}\text{C}$ gestellt. Parallel wurde derselbe Versuch mit Kaninchenserum angestellt.

<u>Ergebnis:</u> <u>Menschenserum, mit Hefe behandelt</u>	
Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param. nach 20 Min. tot	nach 19 Min. tot
<u>Verdünnung 1 : 15</u>	
Alle Param. nach 64 Min. tot	nach 64 Min. tot
<u>Kaninchenserum, mit Hefe vorbehandelt</u>	
Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Alle Param. nach 13 Min. tot	nach 11 Min. tot
<u>Verdünnung 1 : 15</u>	
Alle Param. nach 25 Min. tot	nach 21 Min. tot

Hefe besitzt nicht die Fähigkeit, die paramaecientötende Wirkung im Serum von Mensch und Kaninchen bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufzuheben.

Versuch X c: Auch hier wurde wieder parallel Menschen- und Kaninchenserum geprüft. Die Versuchsbedingungen: 2 ccm defibriniertes Menschen- bzw. Kaninchenserum wurden mit 0,5 ccm gewaschener Bierhefe versetzt, 5 Minuten bei $+30^{\circ}\text{C}$ geschüttelt, 15 Minuten in den Brutschrank mit $+37^{\circ}\text{C}$ gestellt und anschließend 10 Minuten lang mit 4000 U/Min. scharf abzentrifugiert.

Es erfolgte dann eine Verdünnung der Sera im Verhältnis 1 : 5 und 1 : 15 mit abgestandenem Leitungswasser und Paramaecienaufschwemmung bei Zimmertemperatur, worauf die Lösungen in den Brutschrank (+37° C) kamen.

Ergebnisse:

Menschenserum, mit Hefe behandelt	
Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Param. größtenteils nach 140 Min. lebendig	nach 18 Min. tot
Verdünnung 1 : 15	
Param. größtenteils nach 180 Min. lebendig	nach 62 Min. tot
Kaninchenserum, mit Hefe vorbehandelt	
Verdünnung 1 : 5	Kontrollversuch
Param. größtenteils nach 140 Min. lebendig	nach 11 Min. tot
Verdünnung 1 : 15	
Param. größtenteils nach 180 Min. lebendig	nach 23 Min. tot

Hefe scheint die Eigenart zu besitzen, das Serum von Mensch und Kaninchen zu inaktivieren. Diese inaktivierende Wirkung der Hefe kommt somit - was die paramaeciciden Agentien anlangt - dem Erhitzen von Serum 30 Minuten auf +56° C und der Absorption der Serumfaktoren durch die geprüften Heparinoide gleich.

Versuch XI c: Nachdem es gelungen war, die paramaecicide Wirkung des Serums durch Hefe aufzuheben, sollte nun gezeigt werden, daß es möglich ist, die gleichen Ergebnisse mit Zymosan zu erzielen, welches uns freundlicherweise von den Behringwerken und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München zur Verfügung gestellt wurde. Wir danken Herrn Professor Dr. RUHENSTROTH-BAUER für die Überlassung.

Als Versuchsobjekt wurde defibriniertes Rattenserum (aus dem Physiol.-Chem.Inst.d.Univ.München) und Serum vom Kaninchen (I.Med.Univ.Klinik München) gewählt.

Zunächst wurden 2 ccm Rattenserum mit 4 mg Zymosan pro ccm für 75 Minuten bei $+17^{\circ}\text{C}$ suspendiert. Der Properdin-Zymosan-Komplex wurde dann abzentrifugiert, wobei Rest-Properdin (RP) als Überstand blieb.

Dieser Überstand (RP) wurde, wie in den bisher beschriebenen Versuchen, im Verhältnis 1:5, bzw. 1:15 mit Leitungswasser und Parameciaenaufschwemmung verdünnt, in den Brutschrank ($+37^{\circ}\text{C}$) gestellt und in Abständen von 15 Minuten überprüft.

Dasselbe Serum wurde mit Zymosan 75 Minuten lang bei $+37^{\circ}\text{C}$ inkubiert und in der gleichen Weise überprüft.

Dabei zeigte sich, daß nach 90 Minuten noch alle Paramecien lebten und keinerlei Störungen in Bezug auf ihre Motilität zeigten.

Da bei $+17^{\circ}\text{C}$ dem Serum durch Zymosan nur das Properdin entzogen wird, hingegen das Komplement - insbesondere die Komponente C' 3 - unbeeinflusst bleibt, liegt der Schluß nahe, das Ausbleiben der paramaeciciden Wirkung des Serums dem Fehlen des Properdins zuzuschreiben. (1. Stufe der Inaktivierung.)

Wird das Serum bei $+37^{\circ}\text{C}$ 75 Minuten lang in Gegenwart der notwendigen Menge Zymosan weiter inkubiert, so kommt es zur eigentlichen Inaktivierung von C' 3: die paramaecicide Wirkung bleibt gleichfalls aus. (2. Stufe der Inaktivierung.)

Das in gleicher Weise vorbehandelte Kaninchenserum zeigte sinngemäß die gleiche Wirkung.

Das Ergebnis gleichzeitig durchgeführter Kontrollversuche wird in nachfolgender Tabelle deutlich.

Rattenserum

Verdünnung 1:5	Verdünnung 1:15
Alle Param. nach 5,5 Min. tot	Alle Param. nach 11 Min. tot

Kaninchenserum

Alle Param. nach 9 Min. tot	Alle Param. nach 23 Min. tot
-----------------------------	------------------------------

Der Rückstand P.Z. (Properdin-Zymosan-Komplex) wurde bei $+1^{\circ}\text{C}$ dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und dann in leicht alkalischem Phosphatpuffer, dessen pH-Wert 7,5 betrug, von 0,6 Ionenstärke bei $+37^{\circ}\text{C}$ unter ständigem Rühren gehalten. Zymosan wird hierbei abdissoziiert und läßt, da es unlöslich ist, sich durch Zentrifugieren entfernen.

Der so gewonnene Rückstand II wurde in den oben angegebenen Verdünnungen auf seine paramaecicide Wirkung geprüft, wobei sich herausstellte, daß sämtliche Paramaecien innerhalb kurzer Zeit zu Grunde gingen.

Diese starke paramaecicide Wirkung ist als Beweis für die Anreicherung von Properdin im Überstand II leider unbrauchbar, da, wie im Kontrollversuch nachgewiesen werden konnte, der Puffer selbst in der für die Versuchsanordnung unvermeidbaren Konzentration auf die Paramaecien noch lähmend wirkte. Die Durchführung der Dialyse zwecks Entfernung der Puffersubstanz und Reindarstellung des Properdins stieß auf technische Schwierigkeiten.

Nebenbei konnte festgestellt werden, daß die beiden Zymosane (Behringwerke und Physiol. Chem. Inst. d. Univ. München), in derselben Menge angewendet, genau die gleiche inaktivierende Wirkung besitzen.

Versuch XII c: Hier sollte geprüft werden, ob es möglich ist, die paramaeciciden Substanzen im Serum durch Paramaecien selbst zu absorbieren und dadurch die paramaecientötende Wirkung zu schwächen oder aufzuheben.

Zu diesem Zwecke wurde 1 ccm defibriniertes Menschenserum mit 2 ccm abzentrifugierter - also sehr stark angereicherter - Paramaecienaufschwemmung gemischt und bei $+37^{\circ}\text{C}$ in den Brutschrank gestellt. Nach 30 Minuten waren alle Tiere tot.

Die Lösung wurde daraufhin abzentrifugiert und dem Zentrifugat wiederum 2 ccm sehr stark angereicherter Paramaecienaufschwemmung zugesetzt, was eine Verdünnung von 1 : 5 ergab. Nachdem das Gemisch 30 Minuten bei $+37^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank verweilt hatte, wurde abzentrifugiert und auf paramaecientötende Wirkung geprüft, wobei sich ergab,

daß sowohl im behandelten, als auch im unbehandelten Serum nach 20 Minuten keine lebenden Tiere mehr angetroffen wurden.

Der sich hieraus ergebende Schluß ist der, daß die paramaeciciden Agentien bei ihrer Wirkung anscheinend gar nicht, oder aber nur minimal verbraucht werden, so daß ihre Verminderung durch diese Methode nicht nachgewiesen werden kann.

D. Immunisierungsversuch

Um die Paramaecien einer nicht zu starken toxischen Wirkung des Serums auszusetzen, wurde 1 Teil Serum vom Menschen mit 14 Teilen abgestandenem Leitungswasser und 15 Teilen Paramaecienaufschwemmung versetzt, was eine Verdünnung 1 : 30 ergab. Auf diese Weise ist es möglich, eine verhältnismäßig große Zahl von immunisierten Tieren zu gewinnen.

Bei Eintritt der ersten Lähmungserscheinungen nach 60 Minuten - die Paramaecien verloren ihre Motilität und sanken zu Boden - wurde die Lösung kurz abzentrifugiert, das Serum abgegossen und die übriggebliebenen Paramaecien durch zweimaliges Waschen und Zentrifugieren vom restlichen Serum befreit. Die so gewaschenen Tiere wurden in den drei Tage vorher bereiteten Heuinfus mit Salatblättern eingesetzt.

Nach 2 Tagen erholten sich die Paramaecien und schwammen lebhaft umher.

Am dritten Tag wurden sie abermals der gleichen Immunisierungsprozedur unterzogen und zur Erholung für drei Tage in die oben erwähnte Lösung gebracht.

Am vierten Tage bewegten sich die Tiere normal - alle Lähmungserscheinungen hatten sich restlos zurückgebildet -, waren sehr gefräßig und schienen sich sogar vermehrt zu haben.

In diesem Zustand wurden die "immunisierten" Paramaecien mit normalem Serum vom Menschen in einer Verdünnung von 1 : 5 zusammengebracht. Das Ergebnis ist in der folgenden Tabelle kurz zusammengefaßt.

Verdünnung 1 : 5

	Nicht "immune" Paramaecien				"Immune" Paramaecien			
1	Alle Param.	nach 20 Min.	tot		Alle Param.	nach 20 Min.	tot	
2	"	"	"	22 " "	"	"	"	21 " "
3	"	"	"	23 " "	"	"	"	18 " "

Die paramaecientötenden Substanzen im Serum scheinen demnach unspezifischer Natur zu sein; sie hinterlassen nach zweimaliger Einwirkung auf Paramaecien keine Immunität bei diesen.

E. Beziehung der Paramaecicidie zum Gammaglobulin

Geprüft wurde das Serum einer Patientin, die an einer, wahrscheinlich angeborenen, Agammaglobulinämie (0) leidet.

Parallel dazu wurde ein Versuch mit dem Serum einer Patientin, die zur Zeit eine Hypogammaglobulinämie aufweist, angestellt.

Nachdem die üblichen Verdünnungen - 1 : 5 und 1 : 15 - hergestellt worden waren, ergab sich folgendes:

	Verdünnung 1 : 5				Verdünnung 1 : 15			
Agammaglob.	Alle Param.	n. 10 Min.	tot		nach 18 Min.	tot		
Hypogammaglob.	"	"	" 12 " "		" 23 " "			

Die paramaeciciden Stoffe in den geprüften Sera scheinen vermehrt zu sein, da sie die Paramaecien, im Vergleich zu normalem Menschen-serum, in der Hälfte der Zeit töten.

Daraus geht deutlich hervor, daß Gammaglobuline für die paramaecien-tötende Wirkung des Serums nicht verantwortlich gemacht werden können.

B E S P R E C H U N G

Die Versuche der Reihe A zeigen eindeutig, daß menschliches und tierisches Blutserum paramaecientötende Substanzen enthält, die wegen ihrer unterschiedlichen Wirkung beim Menschen und den geprüften Tiergattungen als Properdin-Komplement-ähnliches System anzusprechen

sind. Abgesehen von der biociden Wirkung soll dieses System in unspezifischer Weise an der Immunlyse beteiligt sein.

Änderungen des Properdinspiegels scheinen den Verlauf von verschiedenen, experimentell erzeugten, Infektionen sowie die Empfindlichkeit gegen zahlreiche stoffliche und physikalische Reize (Bakterien, Viren, Strahlen) zu beeinflussen.

Die Untersuchungen von L. PILLEMER (17) über die Höhe des Properdintiters im Blutserum der untersuchten Säugetiergattungen stimmen weitgehend mit eigenen Beobachtungen überein.

Die Versuche der Reihe B ergaben, daß die paramaeciciden Agentien des Serums (Properdin ?) durch die herrschende Temperatur zu beeinflussen sind.

Die im katalytischen Sinne wirkende Erhöhung liegt im Bereich von +17 bis +56 °C. Bei 30-minütiger Einwirkung von Temperaturen, die ober- und unterhalb dieser Schwellenwerte liegen, kommt es zum Ausfall der Paramaecidie entweder durch eine Präcipitation der beteiligten aktiven Stoffe oder durch das Nichterreichen der optimalen Temperatur; hierbei verläuft die wahrscheinlich enzymatische Reaktion so langsam, daß sie mit der hier angewendeten Methode nicht zu erfassen ist.

Die Überprüfung des Verhaltens der Paramaecien gegenüber den unter bestimmten Aspekten gewählten chemischen Verbindungen zeigte in der Versuchsreihe C eine deutliche Beeinflussung des Reaktionsverlaufes.

Wir hatten die berechtigte Hoffnung, daß eine Parallelität zwischen dem Gerinnungsvorgang des Blutes und den ihn beeinflussenden Chemikalien einerseits und den biotischen Vorgängen des Serum-Abwehrsystems und den Paramaecien andererseits besteht.

Unter diesem Gesichtspunkt wurden folgende Reagentien als Prüfstein des Reaktionsvermögens der lebenden Paramaecien benützt: Barium sulfuricum, Permutit, Heparinoid G, Elheparin und Heparin Novo. Diese Stoffe beeinflussten die Paramaecidie des Serums unterschiedlich. Während Barium sulfuricum und Permutit die zur Tötung der Paramaecien notwendige Zeitspanne verhältnismäßig gering erhöhten, erwiesen

sich die Heparionoide untereinander als nahezu indifferent: sie hoben alle die Paramaecicidie des Serums fast völlig auf.

Unterzieht man den Reaktionsablauf einer kinetischen Analyse, so ergeben sich folgende Erwägungen:

Ist die Verzögerung, die mit Barium sulfuricum und Permutit erzielt wurde, auf die Beeinträchtigung der Blutgerinnungszeit zurückzuführen, so müßte ein Gerinnungsfaktor eine nicht unbedeutende Rolle in der paramaecientötenden Wirkung des Serums spielen.

Da wir aus den Untersuchungen von K.J. FELIX und PENDL (4), die später von SEEGERs bestätigt wurden, wissen, daß Barium sulfuricum unter anderem die C¹ Komponente - früher als Mittelstück bezeichnet - des Komplements absorbiert, ist dies wahrscheinlich nicht der Fall.

Im chemischen Verhalten gleichen sich C¹ Komponente und Prothrombin weitgehend. Beide sind in Kohlensäure unlösliche, kohlenhydrathaltige Euglobuline mit sehr ähnlichem isoelektrischen Punkt; sie sind nicht artspezifisch und werden bei +56⁰ C inaktiviert. Dementsprechend ist ein isoliertes Prothrombinpräparat imstande, ein prothrombinfreies und Komplement-inaktives Plasma bzw. dessen Komplement-Funktion zu restituieren.

Die extremen Schwierigkeiten, die mit der Trennung der beiden Stoffe verbunden waren, sind lange Zeit die Basis zur Annahme für die prothrombinspezifische Wirkung des Barium sulfuricum gewesen. Erst R. MARX (8) gelang es, mit Hilfe des Dicumarol das eine auszuschalten, ohne das andere zu beeinträchtigen.

Seit den Untersuchungen von FUCHS und FALKENHAUSEN ist uns auch ein Zusammenhang zwischen Prothrombin und Komplement, bzw. einem Teil desselben, mitgeteilt worden. Tatsächlich vermögen verschiedene Maßnahmen, welche die Gerinnung hemmen, - wie die Applikation von Heparin und Germanin -, nach E.ECKER und L.PILLEMER (3) auch den anaphylaktischen Schock zu bremsen. (WISING, P./24)

Bei Heparin ist jedoch zur komplementhemmenden Wirkung eine wesentlich höhere Konzentration erforderlich, als zur Aufhebung der Ge-

rinnung, während sich die Polyvinyl- und Zellulose-Schwefelsäure-Ester genau umgekehrt verhalten (3).

Interessant ist, zu erwähnen, daß beim Übergang des Prothrombins zu Thrombin auch das Komplement verschwindet. Wird dagegen letzteres bei Antigen-Antikörper-Reaktionen verbraucht, so bleibt das Prothrombin doch erhalten. (13)

Ebenso interessant ist, daß Vitamin K = Mangel beim Huhn sowohl den Prothrombin, als auch den Komplementspiegel vermindert (1). In letzter Zeit sind auch Beziehungen zwischen dem Fibrinolyse-System und Komplement beschrieben worden: Fibrinolysin inaktiviert bei neutraler Reaktion das Komplement (II. Gerinnungsphase). Es wird angenommen, daß das Fibrinolyse-System an der Komplement-Fixation und der Immunhämolysen beteiligt ist (15).

Zusätzlich wurde in der Versuchsreihe C die Bindungsfähigkeit und Affinität der reagierenden Agentien zu Substanzen biotischer Herkunft untersucht. Die Wahl fiel auf Hefe, da nach L. PILLEMER die wirkende Substanz Zymosan im Serum durch eine Art Komplement-Propertin-Bindungsreaktion die Ausscheidung der C³-Komponente herbeiführt, was den Inaktivierungsvorgang einleitet. Die Ergebnisse von L. PILLEMER stimmen mit den im vorigen Abschnitt angegebenen völlig überein.

Schließlich wurde das Blutserum mit Zymosan behandelt. Dieses hat Polysaccharidcharakter, macht mengenmäßig nur etwa 2% der Hefe aus, erzielt jedoch in einer 25 mal geringeren Menge die gleiche inaktivierende Wirkung auf C³ wie die Originalhefe. (16)

Nach einer Inkubationszeit von 75 Minuten bei +17° C, wie auch bei +37° C, verlor das Serum die Eigenschaft, Paramaecien anzugreifen. Wesentliche Unterschiede zwischen dem bei +17° und dem bei +37° C inkubierten Serum wurden nicht beobachtet. Die Überprüfungszeit erstreckte sich über 90 Minuten.

Ob Paramaecien als Testtierchen die Rolle der sensibilisierten roten Blutkörperchen im Rahmen des hämolytischen Tests (Komplementbindungsreaktion) bei der indirekten Propertinbestimmung nach PILLEMER übernehmen und mit dem Überschuß an C³ reagieren, muß offen gelassen werden.

Die Versuche der Reihe D zeigen, daß man Paramaecien gegen normales, defibriniertes Menschen Serum nicht immunisieren kann.

Diese Beobachtung stimmt mit der von M. MASUGI (13) überein. R. RÖSSLE (20) und M. MASUGI (13) ist es jedoch gelungen, Paramaecien gegen spezifisches Serum zu immunisieren. M. MASUGI stellte fest, daß die Wirkung Antiparamaecien Serums ganz anderer Natur ist, als diejenige des normalen Serums. Die Wirkung des letzteren führte er auf den Gehalt an Komplement zurück, weil sie durch Erhitzen während 30 Minuten auf $+56^{\circ}\text{C}$ oder durch kurzes Lagern verschwand. Sie konnte auch nachher durch Hinzufügen von Komplement nicht wieder hergestellt werden.

Was die Wirkung des Komplements anlangt, so schien es M. MASUGI, mehr an der Oberfläche der Paramaecien anzugreifen: die Paramaecien konnten sich von der Wirkung sehr starker Serumkonzentrationen erholen. Wenn sie aber starben, dann starben sie immer unter der Erscheinung der Zerfließung. Dasselbe wurde auch bei den hier angestellten Versuchen beobachtet.

Im Gegensatz zu dem vorher Gesagten, ist die spezifische Wirkung, die durch Immunisierung entstanden ist, thermostabil; sie verschwindet auch nicht durch langes Lagern. Das spezifische Serum wirkt zwar sehr ähnlich dem oben beschriebenen, unterscheidet sich jedoch in zwei wichtigen Punkten: Es braucht mehr Zeit, als das Komplement, um in seiner Wirkung manifest zu werden; und es gehen diejenigen Paramaecien, die durch das spezifische Serum gelähmt wurden, immer zu Grunde. Dabei zeigen sie keine Zerfließungserscheinungen, sondern sterben offenbar einfach durch Lähmung. M. MASUGI (13) glaubte, das dahingehend deuten zu dürfen, daß das spezifische Serum nicht an der Oberfläche, sondern im Inneren der Paramaecien angreift.

Paramaecien, die sich gegen die spezifische Serumwirkung als hochimmun erwiesen hatten, in Normalserum gebracht jedoch ebenfalls gelähmt wurden - ebenso wie unbehandelte -, deutete er dahin, daß das wirksame Agens (Komplement) des Normalserums und der spezifische Antikörper ganz verschiedene Angriffspunkte haben (Zellmembran und ganze Zelle ?); die Paramaecien haben gegen den Angriff des

Normalserums keine Abwehrmöglichkeit, während sie sich gegen den spezifischen Antikörper erfolgreich zu schützen vermögen.

Wie dem auch sei, es lassen sich aus den Beobachtungen über die Art des Angreifens der biociden Stoffe an Paramaecien keine überzeugenden Schlußfolgerungen in Bezug auf Artspezifität und Immunisierung gegen jene ziehen. Der heutige Stand der Wissenschaft aber und die Erfahrung mit potenten antibiotischen Mitteln, wie Penicillin mit all seinen Abkömmlingen, lehren uns, daß eine Immunisierung und Resistenzsteigerung auch bei den niedrigsten Lebewesen, wie Viren, möglich ist. Ebenso wissen wir, daß viele Mikroben serumfest werden können.

Alle diese Tatsachen veranlassen uns zu der Annahme, daß auch in diesem speziellen Falle eine, wenn auch äußerst geringfügige, Immunisierung zustandekommt.

Die Ergebnisse der Laboruntersuchungen des Blutserums von Patientinnen, die an Agammaglobulinämie bzw. Hypogammaglobulinämie erkrankt sind, lassen folgendes schließen (Reihe E): Die Wirkungsintensität der biociden Substanzen des Serums gegenüber Paramaecien ist gesteigert.

Die hier verwendeten und in den USA von L. PILLEMER untersuchten Blutsera hatten einen normalen bis erhöhten Properdinspiegel.

Der sich daraus ergebende Schluß ist bei Berücksichtigung der Versuchsergebnisse einleuchtend: Die Gammaglobuline können für die paramaecicide Wirkung des Serums nicht verantwortlich gemacht werden.

Worauf der erhöhte Spiegel der biociden Substanzen zurückgeführt werden muß, läßt sich nicht befriedigend beantworten. Die Möglichkeit, daß die Gammaglobuline in einem Bindungsverhältnis mit den erwähnten Substanzen stehen, ist sehr wahrscheinlich.

Die Annahme einer Sensibilisierung des Abwehrsystems im menschlichen Blut durch die Gammaglobuline scheint sich bestätigt zu haben. Aus den vorliegenden Untersuchungen jedoch gehen keinerlei Anhaltspunkte zur Bestimmung eines genaueren Verhältnisses zwischen Gamma-

und Euglobulinen einerseits, und dem humorozellulären Abwehrsystem des Organismus andererseits hervor.

Die schwankenden Ergebnisse - in Bezug auf die Paramaecicidie - dürften sowohl von den Paramaecien (Alter, Ernährungszustand der Kultur und Jahreszeit), als auch von der individuellen Beschaffenheit des menschlichen und tierischen Serums, verschiedener und gleicher Art, ausgehen.

Welche Rolle nun eigentlich Properdin in vivo spielt, konnte bis heute nicht befriedigend erklärt werden. Die aufgestellten Theorien lassen sich nicht durch andere, als rein empirisch gewonnene Tatsachen stützen. So berichten E. FRANK und Mitarbeiter (6), daß der Properdinspiegel bei Hunden, die einem irreversiblen hämorrhagischen Schock ausgesetzt wurden, stark absinkt. Nach Ansicht der Forscher ist die bei einem Schock dieser Art terminal auftretende Bakteriämie durch den niedrigen Prothrombingehalt bedingt. Nach F. HEGEMANN (8) soll Properdin auch eine antipyretische Wirkung entfalten. Es gelang ihm nämlich, nachzuweisen, daß die pyrogene Wirkung gramnegativer bakterieller Lipopolysaccharide durch vorangegangene Inkubation derselben mit frischem Serum neutralisiert werden kann. Den Beweis hierfür lieferte die Tatsache, daß Serum, welches zur Entfernung des Properdins mit Zymosan behandelt worden war, seine Aktivität verlor. Überdies entsteht bei Eluierung des Properdins aus dem Zymosan-Properdin-Komplex - durch einen Puffer mit hoher Ionenstärke - eine Lösung mit antipyretischen Eigenschaften (L. PILLEMER).

Die Frage der Stimulierung der natürlichen Immunität wurde von mehreren Autoren unbefriedigend erörtert. So berichtet D. ROWLEY (21), daß eine rasche Stimulierung nach intravenösen Injektionen von Zellmembranen gramnegativer Bakterien erzielt wurde. Dies gilt insbesondere für Mäuse und soll auf einer Properdinspiegel-Erhöhung im Blute der Maus beruhen, was von L. PILLEMER und Mitarbeitern bestätigt werden konnte.

T.E. FIELD (5) und Mitarbeiter, sowie LANDY und L. PILLEMER (11) glauben, daß die wirksame Fraktion an die Lipopolysaccharide gebunden ist, die in der Zellwand der Bakterien enthalten sind.

Interessanterweise gelang es R.J.DUBOS und R.W. SCHAEGLER (2) nachzuweisen, daß sich diese spezifische Immunität auch auf Mycobakterium tuberculosis und Staphylococcus aureus erstreckt, das heißt auf Organismen, die in vitro auf die bakterizide Wirkung des Properdinsystems nicht ansprechen. Natürlich bleibt die Möglichkeit, daß diese Immunität auf eine Stimulierung der Aktivität von Phagozyten des reticuloendothelialen Systems zurückzuführen ist, als Diskussionsgegenstand offen.

Die Möglichkeit, daß es sich um eine opsoninähnliche Eigenschaft des Properdins handeln könnte, die die Aufnahme von Bakterien durch Phagozyten beschleunigt, beziehungsweise um ein Eingreifen in die intrazelluläre Verdauung, scheint nach den hier vorgenommenen Paramecien-Experimenten eliminiert zu sein. Es kann nämlich als bewiesen gelten, daß zentrifugiertes Serum, ohne nachher mit Zymosan behandelt zu werden, jeglicher zellulärer Elemente entbehrt, trotzdem aber in vitro die besprochene Wirkung behält. Dabei ist äußerst schwierig zu bestimmen, welche Rolle rein humorale, bakterizide Mechanismen spielen, da es im Versuch nicht möglich ist, eine bakterizide Wirkung des Mäuseserums gegenüber komplementsensiblen, gramnegativen Organismen nachzuweisen.

Die prospektive Bedeutung des Properdins erstreckt sich besonders auf das Gebiet der Immunität. Allerdings kann die Stimulierung der unspezifischen Immunität - die ursprünglich vollständig der Erhöhung des Properdinspiegels zugeschrieben wurde - als therapeutische Maßnahme vorerst nicht Verwendung finden. Zu diesem Zwecke brauchen wir nämlich ein Präparat, welches die spezifische Immunität ebenso stark stimuliert, wie die zur Zeit experimentell verwendeten Lipopolysaccharid-Komplexe, jedoch eine viel geringere Toxizität aufweist.

Die größte therapeutische Anwendbarkeit des Properdins liegt in der Möglichkeit der Verabreichung an den Organismus, um diesen - wie angenommen wurde - vor den Nachwirkungen einer Ganzkörperbestrahlung nach Atomexplosionen zu schützen. Diese mögliche Anwendbarkeit erstreckt sich natürlich auf sämtliche Strahlungsarten, wie Röntgen-, Radiumstrahlen u.a., womit man auch - durch Erhöhung der HED - entscheidender in die Blastombekämpfung eingreifen könnte.

Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurden Seren von verschiedenen Tieren und Menschen auf ihre paramaecientötende Wirkung geprüft.

Die verschiedenen Seren von Mensch und Tier weisen eine unterschiedliche Paramaecicidie auf, die bei der Ratte am größten ist. Die weitere Reihenfolge in Richtung immer geringerer Paramaecicidie lautet: Hausschwein - Kaninchen - weiße Maus - Mensch - Meerschweinchen.

Die paramaecientötende Wirkung der Seren konnte eindeutig durch Temperaturen verändert werden, wobei die in katalytischem Sinne wirkende Erhöhung im Bereich zwischen $+17^{\circ}$ und $+56^{\circ}$ C liegt.

Die Beeinflussbarkeit der Seren bezüglich ihrer Paramaecicidie durch chemische Verbindungen - geringfügig durch Barium sulfuricum und Permutit, sehr stark durch Hefe, Zymosan und Heparinoide - wurde eindeutig bewiesen.

Eine Immunisierung der Paramaecien gegen normales Blutserum konnte nicht erreicht werden.

Auf Grund der Versuchsergebnisse, die mir Seren von Patientinnen, welche an einer Agammaglobulinämie bzw. Hypogammaglobulinämie litten, erzielt wurden, ist der Schluß, es könnten die Gammaglobuline für die paramaecicide Wirkung des Serums verantwortlich gemacht werden, nicht erlaubt.

Unsere Versuchsergebnisse machen es wahrscheinlich, daß die paramaecientötende Wirkung des normalen Serums sich auf das Properdin-Komplement-System zurückführen läßt, bzw., daß dieses System mindestens zu einem wesentlichen Teil an der Serumpaemacicidie beteiligt ist.

L I T E R A T U R

1. Büsing, K.H. und Zuzak:
Zeitschr.Immunit.Forsch. 102 (1943): 401
2. Dubos, R.J., Schaedler, R.W.:
I.Exp.Med. 104 (1956): 53
3. Ecker, E. und Pillemer, L.:
I. of Immun. (1940/41):
4. Felix, K.J., Pendl, und Roka, L.:
Z. Physiol. Chem. 198 (1947): 284
5. Field, T.E., Howard, I.G., Whitby, I.L., Roy, J.:
Army Med. Corps 101 (1955): 324
6. Frank, E., Fine, J., Pillemer, L.:
Proc. Soc. Exper. Biol 89 (1955): 223
7. Hamilton: J. of infect. Dis. (1904)
8. Hegemann, F.:
Z. Immunit. Forsch. 111 (1954): 202
9. Hegedüs und Greiner:
Z. Immunit. Forsch. 92 (1938): 1
10. Knüchel, F.: Biochem. Zschr. Band 2, Heft 3 (1947): 318
11. Landy, L. und Pillemer, L.:
J. Expr. Med. 103 (1956): 823
12. Marx, R., Bayerle, H. und Skibbe, J.:
Arch. exp. Path. u. Pharm. 206 (1940): 344
13. Masugi, M.: Krank. Forsch. 5 (1927/28): 375
14. Pillemer, L., Seifter, Ecker, E.:
J. exp. Med. 1942: 75 u. 421
15. Pillemer, L.: J. exp. Med. 1953: 97

16. Pillemer, L. und Ecker, E.:
J. exp. Med. 1941: 137 u. 139
17. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, Ross, Todd, E.W. und
Wardlow, A.C.:
Science 120, No. 3112, (1954): 279 - 285
18. Pillemer, L., Melvin, D., Schönberg, Blum, L., Wurz, L.:
Properdin-System and Immunity; II Interaction
of the Properdin-System with Polysaccharides.
Science (Sept. 23, 1955), Vol. 122, No. 3169
19. Pillemer, L.: The Properdin-System.
Transaction of the New York Academy of
Science. Ser. II, Vol. 17, No. 7 (1955).
20. Rössle, R.: Arch. f. Hyg. 54 (1905)
21. Rowley, D.: Lancet 268 (1955) : 232
22. Tachenouchi: J. of infect. Dis. 23 (1918)
23. Wardlow, A.C. u. Pillemer, L.:
J. of exp. Med. 103 (1956): 553
24. Wising, P.: Acta med. Scand. 141 (1952)

L E B E N S L A U F

Am 19. 3. 1925 wurde ich als Sohn des Intendanturrates Josef Hartmann und dessen Ehefrau Anna in Dobromil geboren. Nach Beendigung der Volksschule besuchte ich die Oberschule für Jungen zunächst in Przemyśl, dann in Lemberg und legte im Frühjahr 1943 dortselbst die Reifeprüfung ab. Nach kurzer Tätigkeit in der Stadtverwaltung wurde ich zum Wehrdienst eingezogen. Im Jahre 1948 kehrte ich aus der Kriegsgefangenschaft zurück und bekam eine Anstellung als Leiter der Auswanderungsabteilung in Bremen, die ich bis 1952 innehatte.

Im Wintersemester 1952/53 begann ich an der Universität München mit dem Studium der Medizin. Die ärztliche Vorprüfung legte ich nach dem Wintersemester 1954/55 in München ab.

Am 28. Mai 1958 vollendete ich mein Studium an der Universität München, an welcher ich im übrigen während des ganzen Studiums verblieben war, mit dem medizinischen Staatsexamen.

